

 **UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**EFEITO DO HERBICIDA ROUNDUP® SOBRE A ESTABILIDADE
DE MEMBRANAS DE ERITRÓCITOS DE COELHOS E DE FRANGOS**

Estudante: **Maria Thereza Alves Batista**
Orientadora: **Professora Dra. Ana Maria Bonetti**
Co-orientador: **Professor Dr. Tales Alexandre Aversi-Ferreira**

UBERLÂNDIA, MG

2008



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**EFEITO DO HERBICIDA ROUNDUP® SOBRE A ESTABILIDADE
DE MEMBRANAS DE ERITRÓCITOS DE COELHOS E DE FRANGOS**

Estudante: **Maria Thereza Alves Batista**
Orientadora: **Professora Dra. Ana Maria Bonetti**
Co-orientador: **Professor Dr. Tales Alexandre Aversi-Ferreira**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Genética e Bioquímica (área de Genética)

UBERLÂNDIA, MG

2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

B333e Batista, Maria Thereza Alves, 1980-
Efeito do herbicida Roundup® sobre a estabilidade de membranas de
eritrócitos de coelhos e de frangos / Maria Thereza Alves Batista. - 2008.
60 f. : il.

Orientadora: Ana Maria Bonetti.
Co-orientador: Tales Alexandre Aversi-Ferreira.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Uberlândia, Pro-grama de Pós-Graduação em Genética e
Bioquímica.
Inclui bibliografia.

1. Bioquímica - Teses. I. Bonetti, Ana Maria. II.
Aversi-Ferreira, Tales Alexandre. III. Universidade Federal
de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e
Bioquímica. IV. Título.

CDU: 577.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**EFEITO DO HERBICIDA ROUNDUP[®] SOBRE A ESTABILIDADE
DE MEMBRANAS DE ERITRÓCITOS DE COELHOS E DE FRANGOS**

Estudante: Maria Thereza Alves Batista

Comissão examinadora

Presidente: Prof^a.Dr^a. Ana Maria Bonetti (Orientadora)

Examinador: Prof.Dr. Nilson Penha Silva

Examinador: Prof.Dr. Cirano Ulhôa

Data da defesa: 30/06/2008

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas da PGGB para elaboração da dissertação de mestrado foram contempladas.

Prof^a.Dr^a. Ana Maria Bonetti
(Orientadora)

DEDICATÓRIA

Dedico à minha querida Ana Tereza da Cruz Costa e Geraldo Costa Negro que com seu amor permitiram o meu crescimento, à Deus, senhor do universo que nos concede a dádiva da vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por todas as oportunidades e pessoas colocadas em minha vida, por me acompanhar e proteger sempre e pelas experiências que permitem meu crescimento.

À minha querida mãe Elizenia por seu amor, sua amizade, apoio e por dividir comigo a felicidade de cada vitória.

À minha irmã Anna Luiza, minha grande amiga por seu carinho e companheirismo.

Às minhas maravilhosas tias Beu, Cássia, Cleide, Dica e Elizabeth por seu amor, atenção, cuidados e por encherem minha vida de alegria.

Às minhas primas Amanda e Fernanda, amigas para toda a vida.

Ao meu pai, que apesar de distante, está sempre presente em minha vida.

Aos amigos Lúbia e Humberto companheiros fiéis e indispensáveis por dividirem comigo as dificuldades, as descobertas, as alegrias, os erros e os acertos deste percurso. Sem vocês jamais teria conseguido.

À Mayra pelo companheirismo e amizade, pelos conselhos e ajuda em todos os momentos.

Às amigas Lucélia e Andréia pelo companheirismo e auxílio durante a realização deste trabalho.

À Cristiene pela bondade e imensa ajuda durante a realização dos experimentos.

Aos colegas de laboratório pela ajuda oportuna em inúmeros momentos.

Ao Prof. Dr. Nilson Penha Silva pelo exemplo de sabedoria e integridade, pela boa vontade e pelas sugestões indispensáveis.

Ao Prof. Dr. Cirano Ulhoa por gentilmente ceder seu laboratório para realização do trabalho experimental.

A Prof^a. Dr^a. Ana Maria Bonetti pela oportunidade.

Ao Prof. Dr. Tales Alexandre Aversi Ferreira pela oportunidade, ajuda nos momentos difíceis e pelos ensinamentos úteis para toda a vida.

À Prof. Nadja pela gentil doação do sangue dos frangos de corte, e à Carla por gentilmente doar as amostras de sangue de coelho, necessárias a realização dos ensaios experimentais.

À todos aqueles que com sua mão amiga, direta ou indiretamente participaram da realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

ÍNDICE

	Página
Abreviaturas.....	vi
Apresentação.....	01
Capítulo 1 (Fundamentação Teórica).....	02
Capítulo 2 (Parte Experimental).....	25
Resumo.....	26
Abstract.....	27
Introdução.....	28
Material e métodos.....	32
Resultados.....	33
Discussão.....	43
Conclusões.....	46
Referências.....	47

ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferase
AMPA	Ácido amino-metil-fosfônico
AST	Aspartato aminotransferase
CAT	Catalase
EPSPS	5-enolpiruvoil-shikimato-3-fosfato sintetase
GPx	Glutathiona peroxidase
AChE	Acetil-colinesterase
LP	Lipoperoxidação lipídica
OC	Inseticidas organo-clorados
OP	Inseticidas organo-fosforados
POEA	Polioxietilenoamino
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

APRESENTAÇÃO

A grande extensão do território brasileiro reservado a prática agrícola, seja para fins alimentícios ou biotecnológicos, como a produção de biocombustíveis tem como consequência um exacerbado uso de pesticidas.

Apesar das vantagens trazidas por estas substâncias, que permitem um maior rendimento agrícola, impedindo a ação de pragas que prejudicam as plantações, muitas são as desvantagens associadas ao seu uso, como a perda de espécies economicamente importantes, o surgimento de espécies de pragas resistentes, que levam a necessidade do desenvolvimento de substâncias cada vez mais fortes e os danos causados por essas drogas a saúde dos organismos não alvos, que acabam entrando em contato com as mesmas, pela ingestão de alimentos, água ou pelo ar.

Dentre os pesticidas usados no Brasil o herbicida organofosforado Roundup[®] está entre os mais usados. Apesar de ser amplamente conhecido como uma droga de baixa toxicidade, classificado no grau III pela ANVISA, e caracterizado por atuar exclusivamente em uma rota metabólica presente apenas em plantas, o Roundup[®] tem causado danos à saúde de organismos animais.

Nosso objetivo foi avaliar os efeitos do Roundup[®] sobre a estabilidade de eritrócitos de frangos de corte e de coelhos, utilizando concentrações crescentes do herbicida em solução 0,9% de NaCl.

No primeiro capítulo caracterizamos os herbicidas organofosforados, principalmente o Roundup[®], e seus efeitos danosos aos organismos, às membranas biológicas e a importância dos eritrócitos como modelo de estudo das membranas e como uma das vias de transporte desses compostos no organismo.

No segundo capítulo testamos o efeito *in vitro* do herbicida Roundup[®] dentro das especificações de segurança para uso na agricultura, indicadas pelo fabricante, na estabilidade osmótica de eritrócitos de frangos de corte e coelhos.

CAPÍTULO 1

Fundamentação Teórica

AÇÃO E TOXICIDADE DO HERBICIDA GLIFOSATO E SUA INTERAÇÃO COM A ESTRUTURA CELULAR

Os pesticidas organofosforados

O uso de pesticidas organofosforados (OP) é bastante intenso e comprovadamente gera efeitos deletérios sobre organismos vivos [GULTEKIN *et al.*, 2001] sendo os mesmos responsáveis por cerca de 100.000 vítimas de envenenamento por ano no mundo [ZILKER e HIBLER, 1996].

Em geral, os OPs apresentam natureza neurotóxica, pela ação inibitória sobre a atividade da colinesterase neuronal, que normalmente ocorre pela fosforilação da enzima acetilcolinesterase (AChE) [WOREK *et al.*, 1997, 1999]. Os sinais e sintomas característicos de intoxicação aguda por organofosforados em sua maioria resultam em crise colinérgica [THIERMANN *et al.* 1999]. Já a exposição crônica a organofosforados pode gerar náuseas, dores de cabeça e confusão mental [O'MALEY, 1997].

Ainda que a AChE seja um alvo clinicamente importante da exposição ao OP, outras proteínas também formam uma ligação covalente com o mesmo, dependendo apenas da identidade do OP [CASIDA e QUISTAD, 2004]. Essas proteínas são classificadas como alvos secundários, e dentre elas podemos citar carboxilesterase e butirilcolinesterase [CASIDA e QUISTAD, 2004].

Apesar da maioria dos OP induzirem crise colinérgica, os sintomas de intoxicação podem variar dependendo do tipo de OP. Por exemplo, a administração de uma dose baixa do OP Fenthion diminui a atividade motora de ratos em 86%, mas não altera a resposta a uma agressão mecânica na cauda, enquanto uma dose baixa de Paration não altera atividade motora, mas diminui a resposta a uma agressão mecânica na cauda [MOSER, 1995].

Em alguns casos os níveis da AChE não são alterados. Trabalhadores que manufaturam o pesticida OP Quinalfos têm escores significativamente baixos de memória, habilidade de aprendizagem, vigilância ou resposta motora, enquanto seus níveis de atividade de colinesterase sanguínea são iguais aos de sujeitos que não trabalham na manufatura desses compostos [SRIVASTAVA *et al.*, 2000].

Um efeito carcinogênico de pesticidas OPs tem sido postulado [RUPA *et al.* 1989, FIGA-TALAMANCA *et al.*, 1993] e um aumento na incidência de inúmeros tipos de câncer em pessoas que vivem em fazendas, tem sido associado a constante exposição dessas pessoas a estas substâncias [FORASTIERE *et al.*

1993, VIEL e CHALLIER, 1995, WIKLUND e DICH, 1995, ZAHM , 1997, WESSELING, 1999].

A exposição oral crônica ao OP Diazinon causa doenças nos órgãos do sistema imune que são prováveis comprometedoras de sua função. As lesões após a exposição são limitadas e órgão-específicas, com mudanças histoquímicas implicando em mudanças dramáticas e deletérias no metabolismo [HANDY *et al.* 2002].

A reprodução humana, bem como a sobrevivência de fetos e recém nascidos, têm sido afetados pela exposição a pesticidas OP a níveis que normalmente são considerados seguros. Existem evidências de prejuízo à fertilidade devido à redução na qualidade do sêmen e possivelmente aos baixos níveis de testosterona em homens expostos, todavia os efeitos sobre hormônios reprodutivos femininos são inconclusivos [PEIRIS-JOHN e WICKREMASINGHE, 2008].

Evidências sugerem que OPs interferem negativamente no crescimento e desenvolvimento do feto quando a exposição ocorre antes do nascimento [CRISOSTOMO e MOLINA 2002; DABROWSKI *et al.*, 2003, PEIRIS-JOHN e WICKREMASINGHE, 2008]. A sobrevivência do neonato é comprometida em populações expostas aos pesticidas em relação a populações não expostas [PEIRIS-JOHN e WICKREMASINGHE, 2008] e essa exposição leva a alterações no período gestacional [CRISOSTOMO e MOLINA, 2002; DABROWSKI *et al.*, 2003]. Outro problema é a constatação de uma associação entre exposição pré-natal a pesticidas OP e desenvolvimento mental. Problemas sérios de desenvolvimento foram apresentados por 372 crianças aos 24 meses de idade, filhas de famílias latinas que trabalham em fazendas na Califórnia [ESKENAZI *et al.* 2007].

A imersão de coelhos no OP diazinon em baixa (0,6 mg/L) e alta (3 mg/L) concentrações por 10 segundos causou anemia, diminuição nas quantidades de proteínas totais do plasma, diminuição da enzima citocromo P-450, alterações na atividade da AChE no tecido cerebral e renal e alterações histopatológicas nas células do tecido renal. Lesões nos túbulos renais, tecido nervoso e mudanças histoquímicas foram refletidas pelas mudanças dos depósitos de glicogênio nos hepatócitos dos animais expostos [YEHIA *et al.* 2007]. Todas essas alterações

demonstram a toxicidade deste OP aos animais usados e mesmo em animais que sofrem a aplicação deste produto para se livrarem de determinadas espécies de carrapatos.

O estresse oxidativo é um sinal de toxicidade celular que é induzida tanto por pesticidas organoclorados quanto organofosforados [STEVENSON *et al.*, 1995; RANJBAR *et al.*, 2002]. O estresse oxidativo pode ser induzido ou pela superprodução de radicais livres ou pela alteração nos mecanismos de defesa antioxidante, incluindo enzimas de destoxificação [ABDOLLAHI *et al.*, 2004].

Indução *in vivo* de estresse oxidativo em trabalhadores agrícolas e *in vitro* de cultura de linfócitos tratados com OPs, além danos ao DNA, foram induzidos por estes pesticidas [MUNIZ *et al.* 2007].

O OP dimetoato induziu danos às células de ratos Wistar através da geração de radicais livres. Os núcleos das células do cérebro mostraram mudanças na sua forma e na condensação da cromatina, características da morte celular devido a estresse oxidativo. As mesmas características foram mostradas pelos hepatócitos. As micrografias eletrônicas suportam os dados bioquímicos, indicando que o estresse oxidativo induziu morte de células no cérebro e no fígado na dose de 30 mg/kg nos animais tratados com dimetoato [SHARMA *et al.*, 2005].

Outro sinal de toxicidade celular e molecular dos OPs é a peroxidação lipídica (PL) [YAMANO e MORITA 1992; BAGCHI *et al.*, 1995; BACHOWSKI *et al.*, 1997; GULTEKIN *et al.* 2000B, 2001]. Altas doses do OP dichlorvos estimulam a PL através do aumento no plasma dos níveis da enzima malonaldeído e da diminuição da atividade da catalase (CAT) nos eritrócitos de ratos Swiss [YARSAN e CAKIR, 2006]. Em estudos *in vitro* e *in vivo* os OPs alteraram a atividade de enzimas antioxidantes CAT, superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GPx) [GULTEKIN *et al.* 2000B, 2001, LÓPEZ *et al.* 2007], além de diminuir a atividade da AChE [LÓPEZ *et al.* 2007].

A exposição por 30 dias de ratos ao pesticida OP dimetoato, em doses de 6 e 30 mg/kg induziu um aumento da citocromo P-450 nos microsomos e um conseqüente aumento na produção de radicais oxigênio. Foi observado um aumento paralelo no índice de PL, evidenciado pela significativa elevação na

quantidade de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) [SHARMA *et al.*, 2005].

O herbicida Roundup®

O inseticida organofosforado Roundup® é um dos herbicidas mais usados no Brasil e no mundo [GÉHIN *et al.* 2006; BAYLIS, 2000; WOODBURN, 2000]. Seu princípio ativo é o glifosato (N-fosfonometil-glicina), pertencente ao grupo químico das glicinas substituídas [WILLIAMS *et al.*, 2000]. Ele foi descoberto em 1970 e passou a ser utilizado no Brasil a partir de 1978.

Ele atua exclusivamente em plantas, impedindo seu crescimento através da inibição da atividade da enzima 5-enolpiruvato-shikimato-3-fosfato sintetase (EPSPS), responsável pela biossíntese do corismato, precursor na síntese dos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano [WILLIAMS *et al.*, 2000]. É considerado um herbicida pós-emergente, de ação sistêmica, não-seletivo e de amplo espectro de ação [ÇAGLAR e KOLANKAYA, 2007].

O glifosato é um composto anfótero, com valores de pK_a variados. Geralmente é comercializado na forma de sal de isopropilamônio. Por ser polar e altamente solúvel em substâncias aquosas, ele se complexa facilmente. Ele se liga fortemente as partículas do solo, possuindo normalmente uma vida média de 45-60 dias, mas pode chegar a persistir por até 170 dias [VEREECKEN, 2005]. A alta polaridade da sua molécula torna-o praticamente insolúvel em solventes orgânicos [WILLIAMS *et al.*, 2000].

A complexação do glifosato com íons metálicos e sua adsorção em superfícies minerais pode afetar sua degradação, distribuição, e bio-utilidade no solo e lençóis freáticos. Ele é pertencente a uma classe única de agentes fortemente quelantes, e por sua capacidade de adsorção ele pode se tornar mais persistente no solo [PESSAGNO *et al.* 2008]. Ao se associar às partículas do solo e à água, o glifosato pode ser transportado, pela força das chuvas, para regiões próximas ao local onde ele foi aplicado [PERUZZO *et al.*, 2008]. A sua principal rota de degradação no ambiente é por meio de microorganismos presentes no solo, sendo o AMPA seu principal metabólito e o ácido fosfônico e dióxido de carbono seus produtos finais [WILLIAMS *et al.*, 2000].

O Roundup® é normalmente formulado com água a 2.13 M (356 g/L ácido

livre ou 480 g/L sal de isopropilamina) e surfactante, adicionado para permitir sua penetração na superfície da planta e, conseqüentemente, melhorar sua efetividade, além de outras substâncias consideradas inertes, presentes em sua composição. O surfactante predominantemente usado no Roundup[®] é polioxietileno amino (POEA), sintetizado a partir de ácidos graxos derivados de animais [WILLIAMS *et al.*, 2000].

O Roundup[®], devido a seu caminho biológico específico, que não se encontra presente nos animais, exerce seu efeito herbicida somente em plantas e alguns microorganismos. Por isso, tanto o glifosato puro, como suas formulações comerciais eram considerados seguros, de acordo com testes experimentais [WILLIAMS, 2000]. No entanto, a segurança do Roundup[®], bem como a do glifosato, à saúde animal vem sendo questionada [JIRAUNGKOORSKUL *et al.*, 2003, TSUI e CHU, 2008, LANGIANO e MARTINEZ, 2008] .

Alguns estudos comprovam que o Roundup[®] é mais tóxico que seu componente ativo, o glifosato [GRISOLIA, 2002, BRADBERRY *et al.* 2004]. Essa maior toxicidade exibida pelo Roundup[®] provavelmente se deve ao efeito sinérgico do princípio ativo e dos surfactantes adicionados, juntamente às substâncias inertes [PEIXOTO, 2005; BRADBERRY *et al.* 2004; GRISOLIA, 2002].

O surfactante POEA tem sido indicado como responsável pela maior toxicidade conferida ao Roundup[®] [GLUSCZAK *et al.*, 2006; PIENIAŻEK *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2005].

Como o Roundup[®] é utilizado também para o controle de ervas daninhas que se desenvolvem em ambientes aquáticos, glifosato e, possivelmente, POEA, têm sido detectados em concentrações relativamente altas em algumas amostras de água e sedimentos [TSUI e CHU, 2008], ainda que essas concentrações tenham permanecido transitoriamente nesses ambientes. A potencialização da toxicidade do Roundup[®], devido à presença do surfactante POEA, tem sido demonstrada sob condições laboratoriais, em diferentes níveis tróficos de organismos aquáticos: bactérias, algas, protozoárias e zooplâncton [TSUI e CHU, 2003].

Ao analisar a toxicidade aquática de diferentes formulações a base de glifosato em diferentes organismos e sob diferentes condições ambientais, Tsui e

Chu (2003) constataram que a ordem de toxicidade das substâncias testadas foi POEA > Roundup® > glifosato ácido > glifosato de isopropilamônio. Das sete espécies testadas, pertencentes aos grupos das bactérias, algas, protozoários e crustáceos, o POEA foi tóxico a todos os organismos. O grau de toxicidade do Roundup® foi cerca de 4 a 5 vezes maior entre microalgas e crustáceos que entre bactérias e protozoários. Sua toxicidade foi maior com o aumento do pH [TSUI e CHU, 2003].

Alterações histológicas foram observadas no fígado, brânquias e pulmões de *Oreochromis niloticus* após exposição aguda e crônica a concentrações subletais de Roundup® [JIRAUNGKOORSKUL *et al.*, 2002, 2003].

A exposição do peixe *Leporinos obtusidens* ao Roundup®, nas concentrações de 3, 6, 10 e 20 mg/L de glifosato, por 96 h, gerou uma significativa redução na atividade da acetilcolinesterase do cérebro e em alguns parâmetros metabólicos e hematológicos [GLUSCZAK *et al.*, 2006]. O pesticida Roundup® também induziu a formação de micronúcleos em eritrócitos do peixe *Tilapia rendalli* [GRISOLIA, 2002].

A exposição do peixe *Prochilodus lineatus* a concentrações sub-letais de Roundup® promoveu um aumento na glicose plasmática e na atividade hepática da catalase, indicando ativação de defesas antioxidantes, provavelmente devido a um aumento na geração de peróxido de hidrogênio. A exposição ao Roundup® também induziu uma variedade de alterações histológicas no fígado, como degeneração celular e nuclear, aumento do volume nuclear, vacuolização citoplasmática e nuclear, presença de núcleo picnótico e estagnação da bile. Essas alterações podem prejudicar o funcionamento normal do órgão [LANGIANO e MARTINEZ, 2008] e constituem uma típica resposta ao estresse.

Carpas da espécie *Cyprinus carpio* expostas ao herbicida Roundup®, em concentrações de 205 e 410 mg/L de glifosato, por meia hora apresentaram lesões em seus hepatócitos, caracterizadas pelo aparecimento de estruturas semelhantes à mielina no citoplasma das células e dilatação de suas mitocôndrias, com perda de uma de suas membranas [SZAREK *et al.*, 2000].

A toxicidade subcrônica do herbicida Biocarb®, cujo princípio ativo também é o glifosato, sobre ratos Wistar, provocou um aumento na quantidade das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) no

soro dos animais, além de ter gerado mudanças no tecido hepático, pelo aumento na deposição de fibras reticulares e o aumento das células de Kupfler, indicando que este herbicida interfere no metabolismo do fígado. A grande deposição de fibras colágenas pode causar modificações na difusão de solutos, como proteínas, entre hepatócitos e plasma, o que pode prejudicar a função dos hepatócitos [BENEDETTI *et al.*, 2004].

Ao comparar os efeitos do glifosato e do Roundup® sobre a atividade bioenergética de mitocôndrias isoladas do fígado de ratos, Peixoto (2005) comprovou a toxicidade do Roundup®, diferentemente da do glifosato, que sozinho não foi capaz de induzir os mesmos danos. O Roundup® exerceu uma ação inibitória sobre a fosforilação mitocondrial e sobre os complexos succinato desidrogenase e citocromo C redutase da cadeia transportadora de elétrons. Na concentração de 15 mM, o glifosato presente na preparação de Roundup® inibiu a atividade da ATPase em 60%; sob concentrações acima de 5 mM do herbicida a atividade da ATP sintetase tornou-se quase bloqueada, sendo inibida em 91%, comprovando sua toxicidade a estes complexos enzimáticos e questionando a sua segurança à saúde animal [PEIXOTO, 2005].

Cinco formulações herbicidas diferentes, Amega®, Cargly®, Cosmic®, Roundup 3 Plus® e Roundup Biovert®, todas contendo glifosato como ingrediente ativo, foram usadas em testes experimentais com o ouriço do mar (*Sphaerechinus granularis*). Seus resultados mostraram que os herbicidas causaram uma disfunção no ciclo celular, que variou de um retardo em algumas fases do processo a seu total bloqueio. Este resultado, para o Roundup®, foi atribuído ao efeito sinérgico da molécula do glifosato e ingredientes inertes que constituem suas formulações comerciais. Segundo os autores, estes produtos são pulverizados no ambiente em concentrações de 500 a 4000 vezes maiores que as necessárias para causar efeitos adversos sobre o ciclo celular de *S. granularis*, representando assim uma ameaça a saúde daqueles que se encontram próximos ao local onde ele é aplicado e pode ser inalado [MARC *et al.*, 2004].

Os efeitos do Roundup® também foram testados sobre a transcrição. Ainda utilizando ovos do ouriço do mar *Sphaerechinus granularis*, Marc e colaboradores (2005) demonstraram que o Roundup® nas concentrações de 2 a 8 mM de glifosato, interfere adversamente sobre a transcrição nestes animais, causando

um atraso no tempo de saída dos embriões de dentro dos ovos. Segundo Marc e colaboradores, a interferência do Roundup® no sutil mecanismo de regulação da transcrição, durante o desenvolvimento dos embriões, sugere um efeito potencialmente negativo deste no desenvolvimento inicial, o que pode ser concernente à saúde humana [MARC *et al.*, 2005].

A intoxicação por glifosato pode se dar pela absorção pela pele, por ingestão, pelas vias respiratórias ou transmissão parental [WU *et al.*, 2006]. A aplicação de glifosato pode resultar na presença de resíduos tanto na colheita quanto em animais usados na alimentação humana [AMARANTE JUNIOR *et al.* 2002].

A exposição de ratas grávidas ao glifosato induz uma variedade de anormalidades funcionais na atividade de enzimas específicas no fígado, coração e cérebro das mesmas. A atividade enzimática de desidrogenases das mães e seus fetos foram alteradas por este herbicida [DARUICH *et al.*, 2001]. A ingestão oral de 1% de glifosato por fêmeas grávidas de ratos Wistar gerou diminuição do consumo de água e alimento, e aumento na peroxidação lipídica no fígado das ratas e seus fetos. Este aumento foi maior no fígado dos fetos em comparação com a mãe grávida, e a exposição ao glifosato levou ao aumento da atividade da glutathione peroxidase (GPx) no fígado dos fetos, em contraste com nenhuma mudança nos níveis da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Essa alteração indica que este herbicida apresenta um potencial para alteração do estado redox das células do fígado de fetos que provavelmente apresentam baixos níveis de enzimas antioxidantes, quando estão ainda no ventre materno [BEURET *et al.*, 2005].

Em outro estudo o Roundup® além de mostrar-se tóxico as fêmeas grávidas de ratos Wistar, induziu retardo no desenvolvimento do esqueleto do fetal, ao ser administrado às mães [DALLEGRAVE *et al.*, 2003].

Em humanos, de acordo com um estudo feito com famílias de fazendeiros em Ontario, no Canadá, o herbicida glifosato juntamente com outros pesticidas, foi associado a um aumento no risco de abortos espontâneos, mais especificamente entre a 12ª e a 19ª semanas de gestação, independente do período de ocorrência da exposição. No caso de mulheres que engravidaram com 35 anos ou mais, o risco de aborto espontâneo foi 3 vezes maior quando

comparado a mulheres na mesma idade mas que não foram expostas a este mesmo ingrediente ativo [ARBUCKLE *et al.*, 2001].

A exposição de patos da espécie *Anas platyrhynchos* ao herbicida Roundup® resultou em alterações na estrutura das regiões do testículo e região epididimal, bem como nos níveis de testosterona e estradiol no soro, com mudanças na expressão de receptores androgênicos restrita ao testículo. Os efeitos foram marcadamente dose-dependentes, indicando que este herbicida pode causar desordens na morfofisiologia do sistema genital de animais machos. Em conclusão, os resultados mostram que Roundup® em doses baixas pode induzir efeitos perigosos no sistema reprodutivo de patos machos, que foram manifestados principalmente no ducto epididimal e nos ductos proximais eferentes, sugerindo uma alta sensibilidade desses segmentos, entre os órgãos genitais masculinos da espécie [OLIVEIRA *et al.*, 2007].

A ligação do glifosato a albumina do soro humano foi sugerida por Yue e colaboradores (2007). Utilizando os métodos de fluorescência, espectro CD e UV foi demonstrada a adsorção do glifosato a albumina do soro humano sob as condições estudadas, e a indução de pequenas mudanças na estrutura da proteína. O estudo molecular e a análise termodinâmica sugerem que a ligação do glifosato a albumina pode ser através de pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas [YUE *et al.*, 2007].

Hazarika *et al.*, (2003) demonstrou que os organofosforados podem aumentar a peroxidação lipídica através da sua interação direta com a membrana plasmática da célula. Outros estudos têm demonstrado que o Roundup® ou a molécula do glifosato apresentam um potencial para alterar o caráter antioxidante da célula [HULTBERG, 2007; GEHIN *et al.* 2006; PIENIAZEK *et al.*, 2004;].

Costa e colaboradores (2008) testaram os efeitos do herbicida Roundup® em um ambiente aquático, sobre o estresse oxidativo e a função cardíaca de girinos de sapo boi e observaram no grupo exposto a 1 ppm de Roundup® por 48h o aumento nos níveis das atividades hepáticas da SOD, CAT e nos níveis da PL (81%, 189% e 55%, respectivamente) quando comparados ao grupo controle, demonstrando que o Roundup® tem um impacto negativo, com alto potencial para indução de estresse oxidativo nestes animais, além de observarem alteração no sistema cardíaco [COSTA *et al.*, 2008].

Gehin e colaboradores (2006), utilizando a linha celular epidérmica HaCat, demonstrou que *in vitro*, o tanto o glifosato, quanto a formulação “Roundup 3 Plus®” foi capaz de induzir mudanças significantes no caráter antioxidante da célula, como depleção da glutathione, desordens enzimáticas (CAT, GPx e SOD), e aumentar a PL, pelo aumento significativo de substâncias reativas, o que resultou no aumento da morte celular. Gehin *et al* sugerem que a geração de espécies reativas do oxigênio (ROS) pode estar relacionada à toxicidade de pesticidas formulados à base do glifosato.

O estresse oxidativo causado pelo Roundup® em girinos de sapo-boi foi indicado pelo aumento nos níveis de hidroperóxidos lipídicos nos tecidos, gerados pelo ataque oxidativo aos fosfolipídeos da membrana celular e lipídeos circulantes, indicando um acúmulo de ROS nas células do fígado e músculo esquelético após 48 h de exposição a 1 ppm de Roundup® [COSTA *et al.*, 2008]. Segundo Costa *et al.* 2008, a geração de ROS nestas células, com uma consequente indução de danos, pode ser um dos principais efeitos tóxicos do organofosforado Roundup® a estes animais.

A PL em eritrócitos humanos teve seus níveis aumentados tanto pelo Roundup Ultra 360 SL® como também por seu componente ativo glifosato, quando incubados por uma hora em concentrações de 1000 ppm, em estudos fetos por Pieniazek *et al*, 2004. Outra consequência do Roundup Ultra 360 SL® foi aumento na concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), a partir da dose de 500 ppm, após uma hora de incubação. Neste mesmo estudo os autores detectaram um aumento na atividade da CAT eritrocitária e a oxidação da hemoglobina a metahemoglobina, gerados pelo Roundup ultra 360 SL® e pelo glifosato.

Elevações nos níveis de produção de TBARS em concentrações que são potencialmente encontradas no ambiente pelo uso deste herbicida na agricultura foram também observadas no peixe *Rhamdia quelen* [GLUSCZAK *et al.*, 2007]. Após 96 horas de exposição, esta espécie apresentou alterações em parâmetros metabólicos e enzimáticos, tais como inibição na atividade da acetilcolinesterase, peroxidação lipídica e no catabolismo de proteínas.

Concentrações extracelulares de cisteína, um precursor na síntese da glutathione, foram aumentadas na presença de glifosato em culturas de células

HeLa e células de hepatoma. Todavia, a concentração de cisteína intracelular foi diminuída na cultura de hepatócitos em presença daquele herbicida [HULTBERG, 2007]. Essa interferência nas concentrações de cisteína pode, segundo o autor, explicar a interferência deste herbicida sobre a atividade da GPx observada em alguns estudos.

Ao avaliar o efeito do glifosato, vinclosolin e DPX-E9636 sobre cultura de linfócitos bovinos, Lioi e colaboradores concluíram que os pesticidas testados são genotóxicos sobre estas células, porque essas células quando expostas a aqueles agentes químicos têm seu metabolismo alterado, provavelmente gerando ROS, através de mecanismo ainda desconhecido. Todas as doses testadas de cada pesticida produziram danos citogenéticos, além de uma mudança no estado redox da célula em doses baixas de glifosato e vinclozolin [LIOI *et al.*, 1998]

Tanto o glifosato quanto o Roundup[®] demonstraram efeitos citotóxicos e genotóxicos *in vitro*, em linfócitos humanos, e *in vivo*, em ratos [BOLOGNESI, 1997]. A formulação Roundup Transorb[®], afetou o crescimento de linhagens de *Bradyrhizobium*, uma bactéria simbiote da soja, sob condições laboratoriais [SANTOS *et al.*, 2005].

Em estudos toxicológicos, os eritrócitos constituem uma ferramenta ideal para o estudo de membranas. Os eritrócitos ou células vermelhas, juntamente com outros elementos (células brancas e plaquetas) e plasma compõe o sangue, um fluido especializado na comunicação entre os tecidos [ASHTON, 2007].

O sangue, graças a sua capacidade de transporte, pode servir como um carreador de inseticidas. Os eritrócitos, por sua simplicidade estrutural, são excelentes modelos de estudo das interações entre biomembranas, drogas e outros componentes biologicamente ativos [BARAKAT, 2005, BUKOWSKA, 2007].

A membrana é o primeiro ponto de contato de qualquer substância com a célula e as estruturas e funções das células são criticamente dependentes de suas membranas [COOPER e HAUSMAN, 2007]. Muitas proteínas de membrana, bem como seus lipídeos, são afetados pela inserção de componentes tóxicos que causam mudanças na sua organização estrutural e nas funções das biomembranas [NARENDRA *et al.*, 2007] e, conseqüentemente, afetam a funcionalidade da célula.

A técnica de fragilidade osmótica de eritrócitos expressa a habilidade dessas células em manterem suas membranas estáveis em presença de um agente caotrópico [ALDRICK, 2006]. A mesma constitui-se numa ótima ferramenta de avaliação da toxicidade dos pesticidas sobre os eritrócitos. A possível hemólise provocada nos eritrócitos pelo pesticida pode ser quantificada por medidas espectofotométricas da hemoglobina a 540nm.

O uso dos herbicidas à base de glifosato na agricultura continua a se expandir, particularmente em aplicações envolvendo variedades de plantas que são geneticamente modificadas para tolerar o tratamento com o mesmo [LI *et al.*, 2007]. A expansão de seu uso causa um maior contato dos mesmos com organismos animais que não deveriam sofrer seus efeitos tóxicos, que existem, ainda que este pesticida devesse atuar somente sobre plantas.

Considerações Finais

O uso dos agrotóxicos tornou-se indispensável ao bom rendimento das culturas agrícolas, sendo seu uso imensamente difundido no Brasil. No entanto, seus efeitos prejudiciais sobre o ambiente e os organismos animais são facilmente observados e podem ser comprovados através de estudos experimentais.

Dentre as classes de agrotóxicos os OPs apresentam características toxicológicas específicas. Sua toxicidade pode depender do tipo de OP, da via de intoxicação, do animal contaminado e do meio e grau de contaminação. O OP Roundup[®], apesar de ser conhecido como um herbicida que apresenta toxicidade moderada tem sido associado a inúmeras desordens à saúde dos organismos animais testados, em condições laboratoriais.

Com o advento das plantas transgênicas, resistentes aos herbicidas a base de glifosato, o uso destes compostos tende a aumentar, levando a um conseqüente aumento de seus efeitos tóxicos aos animais e ao ambiente. Uma das vias de transporte desse composto nos organismos é o sangue, que pode ter suas células lisadas bem como a fisiologia de suas células alterada pelo estresse oxidativo gerado, pela mudança do seu estado redox ou pelos danos causados as suas membranas o que compromete suas funções e a saúde do animal

contaminado. A técnica de análise de efeitos de substâncias sobre a estabilidade de membranas é adequada para verificar os efeitos de drogas, inclusive herbicidas sobre membranas, utilizando como modelo o eritrócito.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOLLAHI, M.; RANJBAR, A.; SHADNIA, S.; NIKFAR, S.; REZAIE, A. Pesticides and oxidative stress: a review. **Medical Science Monitor**, v.10, n.6, p.141-147, 2004.

ALDRICH, K.; SAUNDERS, D.K. Comparison of erythrocyte osmotic fragility among ectotherms and endotherms at three temperatures. **Journal of Thermal Biology**, v.26, p.179-182, 2001.

AMARANTE JUNIOR, O. P.; SANTOS, T. C. R.; BRITO, N. M.; RIBEIRO, M.L. Glyphosate: Properties, toxicity, use and legislation. **Química Nova**, v.25, n.4, p. 589-593, 2002.

ARBUCKLE, T. E.; LIN, Z.; MERY, L. S. An Exploratory Analysis of the Effect of Pesticide Exposure on the Risk of Spontaneous Abortion in an Ontario Farm Population. **Environmental Health Perspectives**, v.109, n.8, p.851-857, 2001.

BACHOWSKI, S.; KOLAJA, K. L.; XU, Y.; KETCHAM, C. A.; STEVENSON, D. E.; WALBORG, E. F.; KLAUNIG, J. E. Role of oxidative stress in the mechanism of dieldrin's hepatotoxicity. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, v.27, n.3, p.196–209, 1997.

BAGCHI, D.; BAGCHI, M.; HASSOUN, E. A.; STOHS, S. J. In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. **Toxicology**, v.104, n.1-3, p.129–140, 1995.

BARAKAT, K. K. Effect of Cetain Insecticides on the Stabilization And Lysis of Human and Fish Erythrocyte. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, v.1, n.2, p. 195-199, 2005.

BAYLIS, A.D. Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects. **Pest Management Science**, , v.56, n.4, p.299–308, 2000.

BENEDETTI, A. L.; VITURI, C. L.; TRENTIN, A. G.; DOMINGUES, M. A. C.; ALVAREZ-SILVA, M. The effects of sub-chronic exposure of Wistar rats to the herbicide Glyphosate-Biocarb®. **Toxicology Letters**, v.153, n.2, p.227–232, 2004.

BEURET, C. J.; ZIRULNIK, F.; GIMÉNEZ, M. S. Effect of the herbicide glyphosate on liver lipoperoxidation in pregnant rats and their fetuses. **Reproductive Toxicology**, v.19, n.4, p.501–504, 2005.

BOLOGNESI, C. Genotoxic activity of glyphosate and its technical formulation Roundup. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, n.05, p.1957–1962, 1997.

BRADBERRY, S. M.; PROUDFOOT, A. T.; VALE, J. A. Glyphosate poisoning. **Toxicological Reviews**, v.23, n.3, p.159-167, 2004.

BUKOWSKA, B.; MICHALOWICZ, J.; DUDA, W. Alterations in human red blood cell properties induced by 3- (dimethylamino) phenol (*in vitro*). **Toxicology in vitro**, v.21, p. 1574-1580, 2007.

ÇAĞLAR, S.; KOLANKAYA, D. The effect of sub-acute and subchronic exposure of rats to the glyphosate-based herbicide Roundup. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.25, n.1, p.57-62, 2007.

CASIDA, J. E.; QUISTAD, G. B. Organophosphate toxicology: Safety aspects of nonacetylcholinesterase secondary targets. **Chemical Research in Toxicology**, v.17, n.8, p.983–998, 2004.

COSTA, M. J.; MONTEIRO, D. A.; OLIVEIRA-NETO, A. L.; RANTIN, F. T.; KALININ, A. L. Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original. **Ecotoxicology**, v.17, n.3, p.153–163, 2008.

CRISOSTOMO, L.; MOLINA, V. V. Pregnancy outcomes among farming households of Nueva Ecija with conventional pesticide use versus integrated pest management. **International Journal of Occupational and Environmental Health**, v.8, n.3, p. 232—242, 2002.

DABROWSKI, S.; HANKE, W.; POLANSKA, K.; MAKOWIEC-DABROWSKA, T.; SOBALA, W. Pesticide exposure and birthweight: an epidemiological study in Central Poland. **International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health**, v.16, n.1, p. 31—39, 2003.

DALLEGRAVE, E.; MANTESE, F. D.; COELHO, R. S.; PEREIRA, J. D.; DALSENTER, P. R.; LANGELOH, A. The teratogenic potential of the herbicide glyphosate- Roundup® in Wistar rats. **Toxicology Letters**, v.142, n.1-2, p.45-52, 2003.

DARUICH, J.; ZIRULNIK, F.; GIMENEZ, M. S. Effect of the Herbicide Glyphosate on Enzymatic Activity in Pregnant Rats and Their Fetuses. **Environmental Research**, v.85, n.3, p.226-231, 2001.

ESKENAZI, B.; MARKS, A. R.; BRADMAN, A.; HARLEY, K.; BARR, D. B.; JOHNSON, C.; MORGA, N.; JEWELL, N. P. Organophosphate pesticide exposure and neurodevelopment in young Mexican-American children. **Environmental Health Perspectives** v.115, n.5, p.792—798, 2007.

FIGA-TALAMANCA, I.; MEARELLI, I.; VALENTE, P.; BASCHERINI, S. Cancer mortality in a cohort of rural licensed pesticide users in the Province of Rome. **International Journal of Epidemiology**, v.22, n.4, p.579—583, 1993.

FORASTIERE, F.; QUÉRCIA, A.; MICELI, M.; SETTIMI, L.; TERENCEZONI, B.; RAPITI, E.; FAUSTINI, A.; BORGIA, P.; CALVARIANI, F.; PERUCCI, C. A. Cancer among farmers in central Italy. **Scandinavian Journal of Work Environment & Health**, v.19, n.6, p.382–389, 1993.

GEHIN, A.; GUYON, C.; NICOD, L. Glyphosate-induced antioxidant imbalance in HaCaT: The protective effect of Vitamins C and E. **Environmental. Toxicology and Pharmacology**, v.22, n.1, p.27–34, 2006.

GLUSCZAK, L.; DOS SANTOS, M. D.; CRESTANI, M.; BRAGA DA FONSECA, M.; DE ARAUJO PEDRON, F.; FRESCURA DUARTE, M.; PIMENTAL VIEIRA, V. L. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic

and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 65, n.2, p.237–241, 2006.

GLUSCZAK, L.; MIRON, D. S.; MORAES, B. S.; SIMÕES, R. R.; SCHETINGER, M. R. C.; MORSCH, V. M.; LORO, V. L. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology**, v.146, n.4, p.519–524, 2007.

GRISOLIA, C. K. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. **Mutation Research**, v.518, n.2, p.145–150, 2002.

GULTEKIN, F.; DELIBAS, N.; YASAR, S.; KILINC, I. In vivo changes in antioxidant systems and protective role of melatonin and a combination of vitamin C and Vitamin E on oxidative damage in erythrocytes induced by chlorpyrifos-ethyl in rats. **Archives of Toxicology**, v.75, n., p.88–96, 2001.

GULTEKIN, F.; OZTURK, M.; AKDOGAN, M. The effect of organophosphate insecticide chlorpyrifos-ethyl on lipid peroxidation and antioxidant enzymes (in vitro). **Archives of Toxicology**, v.74, n.9, p.533–538, 2000B.

HANDY, R. D.; ABD-EL SAMEI, H. A.; BAYOMY, M. F. F.; MAHRAN, A. M.; ABDEEN, A. M.; EL-ELAIMY, E. A. Chronic diazinon exposure: pathologies of spleen, thymus, blood cells, and lymph nodes are modulated by dietary protein or lipid in the mouse. **Toxicology**, v.172, n.1, p.13–34, 2002.

HULTBERG, M. Cysteine turnover in human cell lines is influenced by glyphosate. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.24, n.1, p.19–22, 2007.

JIRAUNGKOORSKUL, W., UPATHAM, E. S., KRUATRACHUE, M., SAHAPHONG, S., VICHASRI-GRAMS, S., POKETHITIYOOK, P. Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Environmental Toxicology**, v.18, n.4, p.260–267, 2003.

LANGIANO, V. C.; MARTINEZ, C. B. R. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, Toxicology & Pharmacology, v.147, n.2, p.222–231, 2008.

LEE, C.H.; KAMIJIMA, M.; KIM, H.; SHIBATA, E.; UEYAMA, J.; SUZUKI, T.; TAKAGI, K.; SAITO, I.; GOTOH, M.; HIBI, H.; NAITO, H.; NAKAJIMA, T. 8-Hydroxydeoxyguanosine levels in human leukocyte and urine according to exposure to organophosphorus pesticides and paraoxonase 1 genotype. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v.80, n.3, p.217-227, 2006.

LIOI, M. B.; SCARFÌ, M.R.; SANTORO, A.; BARBIERI, R.; ZENI, O.; DI BERARDINO, D.; URSINI, M. V. Genotoxicity and oxidative stress induced by pesticide exposure in bovine lymphocyte cultures in vitro. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v.403, n.1-2, p.13–20, 1998.

LÓPEZ, O.; HERNÁNDEZ, F. A.; RODRIGO, L.; GIL, F.; PENA, G.; SERRANO, J. L.; PARRÓN, T.; VILLANUEVA, E.; PLA, A. Changes in antioxidant enzymes in humans with long-term exposure to pesticides. **Toxicology Letters**, v.171, n.3, p.146–153, 2007.

MARC, J.; LE BRETON, M.; CORMIER, P.; MORALES, J.; BELLÉ, R.; MULNER-LORILLON, O. A glyphosate-based pesticide impinges on transcription. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.203, n.1, p.1 – 8, 2005.

MARC, J.; MULNER-LORILLON, O.; BELLÉ, R. Glyphosate-based pesticides affect cell cycle regulation. **Biology of the Cell**, v.96, n.3, p. 245–249, 2004.

MOSER, V. C. Comparisons of the acute effects of cholinesterase inhibitors using a neurobehavioral screening battery in rats. **Neurotoxicology and Teratology**, v.17, n.6, p.617–625, 1995.

MUNIZ, J. F.; MCCAULEY, L.; SCHERER, J.; LASAREV, M.; KOSHY, M.; KOW, Y. W.; NAZAR-STEWART, V.; KISBY, G. E. Biomarkers of oxidative stress and

DNA damage in agricultural workers: A pilot study. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.227, n.1, p.97–107, 2008.

NARENDRA, M.; BHATRACHARYULU, N. C.; PADMAVATHI, P.; VARADACHARYULU, N. C. Prallethrin induced biochemical changes in erythrocyte membrane and red cell osmotic haemolysis in human volunteers. **Chemosphere**, v.67, n.6, p.1065-1061, 2007.

O'MALLEY, M. Clinical evaluation of pesticide exposure and poisonings. **Lancet**, v.349, n. 9059, p.1161–1165, 1997.

OLIVEIRA, A. G.; TELLES, L. F.; HESS, R. A.; MAHECHA, G. A. B.; OLIVEIRA, C. A. Effects of the herbicide Roundup on the epididymal region of drakes *Anas platyrhynchos*. **Reproductive Toxicology**, v.23, n.2, p.182–191, 2007.

PEIRIS-JOHN, R. J.; WICKREMASINGHE, R. Impact of low-level exposure to organophosphates on human reproduction and survival. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.102, n.3, p. 239—245, 2008.

PEIXOTO, F. Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. **Chemosphere**, v.61, n.8, p. 1115–1122, 2005.

PERUZZO, P. J.; PORTA, A. A.; RONCO A. E. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. **Environmental Pollution**, v.xx, n.xx, p.xx, 2008. doi:10.1016/j.envpol.2008.01.015.

PESSAGNO, R. C.; TORRES SÁNCHEZ, R. M.; SANTOS AFONSO, M. Glyphosate behavior at soil and mineral-water interfaces. **Environmental Pollution**, v.153, n.1, p.53-59, 2008.

PIENIAŻEK, D.; BUKOWSKA, B.; DUDA, W. Comparison of the effect of Roundup Ultra 360 SL pesticide and its active compound glyphosate on human erythrocytes. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.79, n.2, p.58–63, 2004.

RANJBAR, A.; PASALAR, P.; ABDOLLAHI, M. Induction of oxidative stress and acetylcholinesterase inhibition in organophosphorus pesticide manufacturing workers. **Human & Experimental Toxicology**, v.21, n.4, p.179–182, 2002.

RUPA, D. S.; REDDY, P. P.; REDDI, O. S. Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of cotton field workers exposed to pesticides. **Environmental Research**, v.49, n.1, p.1-6, 1989.

SANTOS, J. B.; FERREIRA, E. A.; KASUYA, M. C. M.; SILVA, A. A.; PROCÓPIO, S. O. Tolerance of Bradyrhizobium strains to glyphosate formulations. **Crop Protection**, v.24, n.6, p.543–547, 2005.

SHARMA, Y.; BASHIR, S.; IRSHAD, T. C. M.; DOGRA, N. T. D. Dimethoate-induced effects on antioxidant status of liver and brain of rats following subchronic exposure. **Toxicology**, v.215, n.3, p. 173–181, 2005.

SRIVASTAVA, A. K.; GUPTA, B. N.; BIHARI, V.; MATHUR, N.; SRIVASTAVA, L. P.; PANGTEY, B. S.; BHARTI, R. S.; KUMAR, P. Clinical, biochemical and neurobehavioural studies of workers engaged in the manufacture of quinalphos. **Food and Chemical Toxicology**, v.38, n.1, p. 65–69, 2000.

STEVENSON, D. E.; KEHRER, J. P.; KOLAJA, K. L.; WALBORG, E. F.; KLAUNIG, J. E. Effect of dietary antioxidants on dieldrin-induced hepatotoxicity in mice. **Toxicology Letters**, v.75, n.1, p.177–183, 1995.

SZAREK, J.; SIWICKI, A.; ANDRZEJEWSKA, A.; TERECH-MAJEWSKA, E.; BANASZKIEWICZ, T. Effects of the herbicide Roundup TM on the ultrastructural pattern of hepatocytes in carp (Cyprinus carpio). **Marine Environmental Research**, v.50, n.1-5, p.263-266, 2000.

THIERMANN, H.; SZINICZ, L.; EYER, F.; WOREK, F.; EYER, P.; FELGENHAUER, N.; ZILKER, T. Modern strategies in therapy of organophosphate poisoning. **Toxicology Letters**, v.107, n.1-3, p.233–239, 1999.

TSUI, M. T. K.; CHU, L. M. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. **Chemosphere**, v.52, n.7, p.1189–1197, 2003.

TSUI, M.T.K.; CHU, L. M. Environmental fate and non-target impact of glyphosate-based herbicide (Roundup®) in a subtropical wetland. **Chemosphere**, v.71, n.3, p.439-446, 2008.

VEREECKEN, H. Mobility and leaching of glyphosate: a review. **Pest Management Science**, v.61, n.12, p.1139-1151, 2005.

VIEL, J. F.; CHALLIER, B. Bladder cancer among French farmers: does exposure to pesticides in vineyards play a part? **Occupational and Environmental Medicine**, v.52, n.9, p.587–592, 1995.

WESSELING, C.; ANTICH, D.; HOGSTEDT, C.; RODRIGUEZ, A. C.; AHLBOM, A. Geographical difference of cancer incidence in Costa Rica in relation to environmental and occupational pesticide exposure. **International Journal of Epidemiology**, v.28, n.3, p.365–374, 1999.

WIKLUND, K.; DICH, J. Cancer risks among male farmers in Sweden. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 4, n.1, p. 81-90, 1995.

WILLIAMS, G. M.; KROES, R.; MUNRO, I. C. Safety Evaluation and Risk Assessment of the Herbicide Roundup and Its Active Ingredient, Glyphosate, for Humans. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.31, n.2, p.117–165, 2000.

WOODBURN, A. T. Glyphosate: production, pricing and use worldwide. **Pest Management Science**, v.56, n.4, p.309–312, 2000.

WOREK, F.; BÄCKER, M.; THIERMANN, H.; SZINICZ, L.; MAST, U.; KLIMMEK, R.; EYER, P. Reappraisal of indications and limitations of oxime therapy in organophosphate poisoning. **Human & Experimental Toxicology**, v.16, n8, p. 466–472, 1997.

WOREK, F.; DIEPOLD, C.; EYER, P. Dimethylphosphoryl inhibited human cholinesterases: inhibition, reactivation, and aging kinetics. **Archives of Toxicology**, v.73, n.1, p.7–14, 1999.

WU, J. Y.; CHANG, S. S.; TSENG, C. P.; DENG, J. F.; LEE, C. C. Parenteral glyphosate-surfactant herbicide intoxication. **The American Journal of Emergency Medicine**, v.24, n.4, p.504-506, 2006.

YAMANO, T.; MORITA, S. Hepatotoxicity of trichlorfon and dichlorvos in isolated rat hepatocytes. **Toxicology**, v.76, n.1, p.69–77, 1992.

YARSAN, E.; ÇAKIR, O. Effects of dichlorvos on lipid peroxidation in mice on subacute and subchronic periods. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.86, n.2, p.106–109, 2006.

YEHIA, M. A. H.; EL-BANNA, S. G.; OKAB, A. B. Diazinon toxicity affects histophysiological and biochemical parameters in rabbits. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v.59, n.3-4, p. 215–225, 2007.

YUE, Y.; ZHANG, Y.; ZHOU, L.; QIN, J.; CHEN, X. In vitro study on the binding of herbicide glyphosate to human serum albumin by optical spectroscopy and molecular modeling. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.90, n.1, p.26–32, 2008.

ZAHM, S. H. Mortality study of pesticide applicators and other employees of a lawn care service company. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v.39, n.11 p. 1055-1067, 1997.

ZILKER, T.; HIBLER, A. Treatment of severe parathion poisoning. In: Szinicz, L., Eyer, P., Klimmek, R. (Eds.), **Role of Oximes in the Treatment of Anticholinesterase Agent Poisoning**. Spektrum, Heidelberg, pp. 9–17. 1996.

CAPÍTULO 2

Trabalho Experimental

EFEITO DO HERBICIDA ROUNDUP® SOBRE A ESTABILIDADE DE MEMBRANAS DE ERITRÓCITOS DE COELHOS E DE FRANGOS

RESUMO

O Roundup® é o herbicida mais utilizado na agricultura brasileira. Ele contém em sua composição o sal do glifosato com isopropilamônio, além do surfactante polioxietilenoamino. Essa combinação aumenta bastante a potência herbicida do glifosato. Embora a destinação do produto seja o controle de ervas daninhas, ele apresenta um grande impacto sobre os organismos animais. Neste trabalho, a potência hemolítica do Roundup foi testada em amostras de sangue de frangos de corte e de coelhos, colhidas na presença de EDTA ou de heparina como anticoagulante. A natureza do anticoagulante utilizado na coleta de sangue interferiu na ação hemolítica do Roundup®. O herbicida produziu lise de eritrócitos de frangos e de coelhos dentro da faixa de concentração recomendada pelo fabricante para uso na agricultura. Os eritrócitos de frangos de corte se mostraram mais resistentes do que os eritrócitos de coelhos contra a lise induzida pelo Roundup®.

Palavras-chave: Glifosato; Roundup®; Eritrócitos; Estabilidade de membrana

ABSTRACT

Roundup® is the most used herbicide in Brazilian agriculture. It contains in its composition the salt of glyphosate with isopropylammonium, beyond the surfactant polyoxy-ethyleneamine. This combination significantly increases the power of the herbicide glyphosate. Although the destination of the product is the control of weeds, it has great impact on the animal organisms. In this work, the hemolytic power of Roundup® was tested in blood samples from broiler chickens and rabbits, harvested in the presence of EDTA or heparin as an anticoagulant. The nature of anticoagulant used in the collection of blood interfered in the hemolytic action of Roundup®. The herbicide produced lysis of red blood cells of chickens and rabbits within the concentration range recommended by the manufacturer for use in agriculture. The red blood cells of broilers were more resistant than the red blood cells of rabbits against lysis induced by Roundup®.

Key words: Glyphosate; Roundup®; Erythrocytes; Membrane stability

INTRODUÇÃO

De acordo com a Companhia Monsanto do Brasil, o Roundup® original é classificado no grau IV como um pesticida moderadamente tóxico, constituído por 41% (peso/peso) de glifosato (N-fosfonometil-glicina) de isopropilamônio, 8% (peso/peso) de POEA e 51% (peso/peso) de ingredientes inertes.

Apesar da rota enzimática de ação do Roundup® não estar presente no organismo animal, já que ele inibe a ação da 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintetase (EPSPS), presente apenas em plantas, o seu contato com o organismo animal provocou efeitos tóxicos tanto *in vitro* quanto *in vivo* (COSTA *et al.*, 2008; ARBUCKLE *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2007; GLUSCZAK *et al.*, 2007).

Alguns estudos comprovam que o Roundup® é mais tóxico que seu componente ativo, o glifosato [GRISOLIA, 2002, BRADBERRY *et al.* 2004]. Essa maior toxicidade exibida pelo Roundup® provavelmente se deve ao efeito sinérgico do princípio ativo e dos surfactantes adicionados junto com outras substâncias inertes [PEIXOTO, 2005; BRADBERRY *et al.* 2004; GRISOLIA, 2002].

A contaminação de organismos animais pelo Roundup® pode se dar pelas vias respiratórias, pele, ingestão ou transmissão parental [WU *et al.*, 2006]. Ao ser pulverizado sobre a cultura agrícola, este herbicida pode contaminar organismos não alvos que estejam presentes no local ou próximo ao local de sua aplicação.

Seus resíduos têm sido detectados em águas, já que seu uso é bastante difundido para controle de ervas daninhas aquáticas, gerando também danos à saúde de animais aquáticos [JIRAUNGKOORSKUL *et al.*, 2002, 2003; TSUI e CHU, 2003; 2008; GLUSCZAK *et al.*, 2006].

Após sua entrada no organismo animal, o Roundup® interfere no funcionamento celular [PEIXOTO, 2005]. Sua presença altera a ativação da defesa antioxidante [LANGIANO e MARTINEZ, 2008], da atividade bioenergética de mitocôndrias [PEIXOTO, 2005] e de enzimas celulares [BEURET *et al.*, 2005], prejudicando a fisiologia celular. Sua ligação à albumina do soro humano foi demonstrada em experimentos *in vitro*, onde pequenas mudanças na estrutura da proteína foram verificadas [YUE *et al.*, 2007].

Experimentos *in vitro* demonstraram a influência deste herbicida nos índices de peroxidação lipídica [GEHIN *et al.* 2006], no caráter antioxidante das células e na geração de substâncias como espécies reativas do oxigênio (ROS) e substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) [PIENIAZEK *et al.*, 2004].

Costa e colaboradores (2008) determinaram um aumento gerado pelo Roundup® nos níveis de hidroperóxidos lipídicos como consequência do ataque oxidativo aos fosfolípidos da membrana e lípidos circulantes nas células do fígado e músculo esquelético de girinos de sapo boi, indicando a ocorrência de aumento na geração de ROS nestas células após exposição ao Roundup®.

A formação das membranas biológicas é baseada nas propriedades dos lípidos, e todas as membranas celulares compartilham uma organização estrutural comum constituída por uma bicamada de fosfolípidos e proteínas associadas. Entre outras funções, tais proteínas são responsáveis pelo transporte seletivo de moléculas através da membrana [CAMPBELL, 2000].

Os fosfolípidos, principais blocos formadores das membranas, são moléculas anfipáticas, unidas principalmente por interações hidrofóbicas. Essas moléculas unem suas cabeças polares, que mantêm constante contato com o meio aquoso, e escondem suas caudas apolares, no interior da bicamada, para que não entrem em contato com a água [CAMPBELL, 2000].

A membrana é o primeiro ponto de contato de qualquer substância com a célula e as estruturas e funções das células são criticamente dependentes de suas membranas [CAMPBELL, 2000]. Muitas proteínas de membrana, bem como seus lípidos, são afetados pela inserção de componentes tóxicos que causam mudanças na sua organização estrutural e nas funções das biomembranas [NARENDRA *et al.*, 2007] e, conseqüentemente, afetam a funcionalidade da célula.

Em estudos toxicológicos, os eritrócitos constituem uma ferramenta ideal para o estudo de membranas. Os eritrócitos ou células vermelhas, juntamente com outros elementos (células brancas e plaquetas) e plasma compõem o sangue, um fluido especializado na comunicação entre os tecidos. Pela comparação com o volume total do fluido extracelular, o volume do sangue é pequeno (70 mL/kg de peso corporal). Todavia, o sangue desempenha uma série de funções, como o transporte de gases e nutrientes, atuação como tampão, estabilização da

temperatura corporal e defesa contra patógenos, além de prevenir perdas de fluido em consequência de injúrias, pelo processo de coagulação [ASHTON, 2007].

As células vermelhas do sangue (RBC) se apresentam sob uma forma bicôncava, sendo 2.6 μm nas laterais, 0.8 μm ao centro, e diâmetro de cerca de 7,8 μm . Esta forma reflete a falta de organelas encontrada nos eritrócitos maduros e o uso do recurso de uma grande área de superfície por volume, que é ideal para o transporte de gases. A forma bicôncava também permite aos eritrócitos formarem pilhas que facilitam o fluxo através dos pequenos capilares, deixando-os flexíveis o suficiente para passarem por esses [ASHTON, 2007].

O fluxo dos eritrócitos através dos capilares depende principalmente da habilidade para deformidade mecânica de sua membrana [YAO e ZHA, 2007] e a injúria a essas células pode prejudicar seu transporte através da microcirculação [BELLARY *et al.*, 1995; CHUNG e HO, 1999]. Entre outras consequências as mudanças nas propriedades da membrana são também caracterizadas pelas alterações na sua fluidez [WATANABE *et al.*, 1990] e conseqüente alteração na função destas células, que é o transporte de gases.

A principal função dos eritrócitos é transportar oxigênio dos pulmões para os tecidos e dióxido de carbono [ASHTON, 2007], juntamente com prótons resultantes dos processos metabólicos [BUKOWSKA, 2007], dos tecidos para os pulmões. Estas importantes funções devem ser feitas eficientemente e, por isso, a estrutura do eritrócito é completamente subordinada as suas tarefas [BUKOWSKA, 2007].

O sangue, graças a sua capacidade de transporte, pode servir como um carreador de inseticidas. Os eritrócitos, por sua simplicidade estrutural, são excelentes modelos de estudo das interações entre biomembranas, drogas e outros componentes biologicamente ativos [BARAKAT, 2005, BUKOWSKA, 2007]. São especialmente vulneráveis já que não possuem capacidade regenerativa e de reparo de membranas [WEBSTER e TOOTHILL, 1987] podendo as injúrias a essas gerar hemólise ou afetar sua deformabilidade [SHIGA e MAEDA, 1980]. A hemólise destas células pode ser facilmente quantificada *in vitro* por medida espectrofotométrica da hemoglobina liberada em solução a 540 nm.

Por sua eficiência no combate a ervas daninhas, o Roundup® é um pesticida amplamente usado na agricultura. Após 34 anos de seu lançamento, algumas espécies de ervas daninhas já desenvolveram resistência a este herbicida. A Monsanto recomenda para uso deste herbicida na agricultura concentrações de 0,5 a 4%L de Roundup®/100L de água.

O conteúdo iônico de nossas células é muito diferente do conteúdo do plasma e do líquido das matrizes extracelulares. Essa diferença é mantida durante toda a vida das células, em geral com um importante gasto de energia pela membrana plasmática ou celular, que regula o intercâmbio de íons e moléculas entre a célula e o meio extracelular [CAMPBELL, 2000].

Dentro de uma mesma espécie animal surgem mudanças no comportamento de transporte de substâncias através da membrana, com o avanço da idade. Frangos jovens e adultos, por exemplo, apresentam diferenças no transporte de alguns solutos através da membrana de seus eritrócitos (DREW *et al.*, 2002). Além disso, diferentes mecanismos de defesas podem ter sido desenvolvidos por estes animais, tornando suas células mais ou menos resistentes a toxicidade exercida pelos compostos presentes em diferentes substâncias estranhas ao seu organismo. A permanência de um pesticida como o Roundup® no organismo animal, ainda que transitoriamente, causa no organismo exposto, alterações que podem e devem ser avaliadas.

Para analisar as diferenças de comportamento de eritrócitos sob a toxicidade do herbicida Roundup Original® estudamos a estabilidade osmótica de eritrócitos de frangos de corte e de coelhos, sob concentrações crescentes do herbicida em solução salina 0,9%. As amostras de sangue foram coletadas utilizando dois diferentes anticoagulantes para também avaliar a influência da natureza do anticoagulante usado nos resultados obtidos.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras de sangue

Amostras de 1 mL de sangue foram colhidas, em seringas contendo uma gota de heparina ou uma gota de EDTA, da veia jugular de coelhos (com médias de idade e de massa corporal de 40 dias e 2000 g, respectivamente), e da veia braquial de frangos (médias de idade e de peso de 90 dias e 1100 g, respectivamente).

Reagentes e equipamentos

Foi utilizado NaCl da marca VETEC, com 99% de grau de pureza, o qual que foi devidamente corrigido durante o preparo das soluções. As medidas de volume foram realizadas em bureta de vidro refratário e pipetas automáticas. As medidas de massa foram feitas utilizando-se balança digital da marca AND, modelo 870. As incubações foram feitas em banho termostaticado da marca Sieger, modelo Stern 6. A centrifugação em centrífuga da marca Excelsa Baby, modelo 2410. As leituras de absorbância foram feitas em espectrofotômetro Micronal modelo B-442.

Determinação da estabilidade de eritrócitos em solução salina fisiológica sob concentrações crescentes de glifosato

Soluções com concentrações de 0 a 40 μL de Roundup[®] em 100 mL de solução, com intervalos de 0,5 μL de Roundup[®] até a solução contendo 6 μL e, posteriormente, com intervalos de 2 μL até a solução contendo 40 $\mu\text{L}/100\text{mL}$ de solução salina fisiológica (NaCl a 0,9%). Essa faixa de concentração, de acordo com as indicações do fabricante do herbicida, está dentro do limite aceitável para uso do mesmo em diversas culturas agrícolas.

Baterias de tubos de ensaio (Eppendorff[®]) em duplicata foram preparadas com 1 mL da solução teste e 10 μL de sangue. Após homogeneização e incubação a 37 °C por 30 minutos para coelhos e 41°C por 30 minutos para frangos de corte, os frascos foram centrifugados por 10 minutos a 1.300xg e o sobrenadante foi analisado por espectrofotometria visível a 540 nm.

Determinação das curvas de transição de lise dos eritrócitos

As dependências dos valores de absorbância a 540 nm (A_{540}) com as concentrações de glifosato foram ajustadas por linhas de regressão sigmoidal, dadas pela equação de Boltzmann,

$$A_{540} = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(D - D_{50})/dD}} + A_2$$

em que A_1 e A_2 representam os valores mínimo e máximo de hemólise, D é a concentração do glifosato, D_{50} representa a concentração do glifosato que causa 50% de hemólise e dD é a amplitude da transição sigmoidal entre A_1 e A_2 .

Edições de gráficos e análises estatísticas

As edições de gráficos e análises estatísticas foram realizadas com o programa Origin 7.5 Professional (Microcal Inc. Massachusetts, EUA).

Somente foram consideradas significantes as linhas de regressão com p menor que 0,05.

A comparação dos valores de D_{50} foi feita por análise de variância (ANOVA), com $p < 0,05$ indicando diferença estatisticamente significativa entre as médias.

RESULTADOS

As amostras de sangue de frangos colhidas com EDTA, após submissão a concentrações crescentes de Roundup[®], em solução a 0,9% de NaCl, apresentaram os valores de absorvância a 540 nm mostrados na **Figura 1**. O valor médio de D_{50} foi $19,30 \pm 0,77 \mu\text{L Roundup}^{\text{®}}/100 \text{ mL de salina}$ (**Tabela 1**), o que significa que sob esta concentração de Roundup[®] 50% das hemácias sofreram lise.

As amostras de sangue de frangos colhidas com heparina produziram o padrão de dependência da absorvância em 540 nm em função da concentração de glifosato presente na solução de Roundup[®] apresentados na **Figura 2**. O valor médio de D_{50} foi de $29,50 \pm 2,40 \mu\text{L Roundup}^{\text{®}}/100 \text{ mL de salina}$ (**Tabela 1**).

Os valores de D_{50} observados para as amostras de sangue de frango colhidas com heparina foram significativamente maiores ($p < 0,05$) do que aqueles obtidos para as amostras colhidas com EDTA (**Tabela 1**).

A **Figura 3** apresenta a análise da toxicidade do Roundup[®] sobre as amostras de sangue de coelho colhidas com EDTA. O valor médio de D_{50} obtido para as amostras de sangue colhidas com EDTA foi de $7,72 \pm 1,01 \mu\text{L Roundup}^{\text{®}}/100 \text{ mL de salina}$ (**Tabela 1**).

A **Figura 4** apresenta a análise da toxicidade do Roundup[®] sobre as amostras de sangue de coelho colhidas com heparina. O valor médio de D_{50} para as amostras de sangue colhidas com heparina foi de $4,98 \pm 0,86 \mu\text{L Roundup}^{\text{®}}/100 \text{ mL de salina}$.

Os valores de D_{50} obtidos para as amostras de sangue de coelho colhidas com EDTA foram significativamente maiores ($p < 0,05$) do que aqueles obtidos para as amostras colhidas com heparina (**Tabela 1**).

As curvas de lise dos eritrócitos humanos foram também analisadas quanto à altura (h) de cada curva de lise (**Tabela 2**). Os valores de h foram significativamente ($p < 0,05$) maiores para as amostras de sangue colhidas com EDTA do que para as amostras colhidas com heparina, tanto para frangos quanto para coelhos.

Outro parâmetro analisados das transições consideradas foi a amplitude (dD) da transição sigmoidal (**Tabela 3**). Os valores de dD foram significativamente

maiores ($p < 0,05$) para a amostras de sangue colhidas em heparina em relação aquelas colhidas em EDTA, tanto para frangos quanto para coelhos.

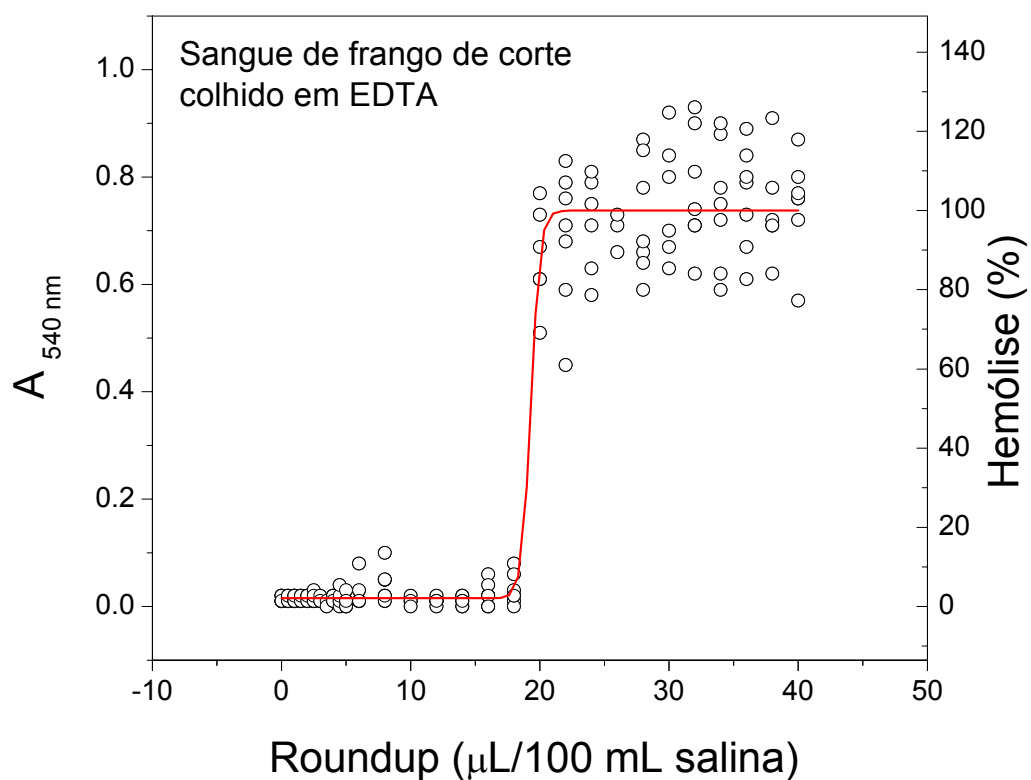


Figura 1. Efeito da concentração do herbicida Roundup, dada em mL da preparação comercial do herbicida por 100 mL de solução salina fisiológica (NaCl 0,9%) sobre a lise de eritrócitos de frangos de corte. Condições: 41 °C; coleta de sangue em EDTA como anticoagulante.

Tabela 1. Valores de D_{50} (média + desvio-padrão), dados em μL de Roundup[®]/100 mL salina, obtidos para amostras de sangue de coelhos e frangos coletadas na presença de EDTA ou heparina como anti-coagulante.

Animal	EDTA	Heparina	p [*]
Coelho	7,72 ± 1,01 (N = 7)	4,98 ± 0,86 (N = 10)	*
Frango de corte	19,30 ± 0,77 (N = 7)	29,50 ± 2,40 (N = 6)	*
p [‡]	‡	‡	

* p < 0,05 indicando diferença estatisticamente significativa entre anti-coagulantes (ANOVA).

‡ p < 0,05 indicando diferença estatisticamente significativa entre animais (ANOVA).

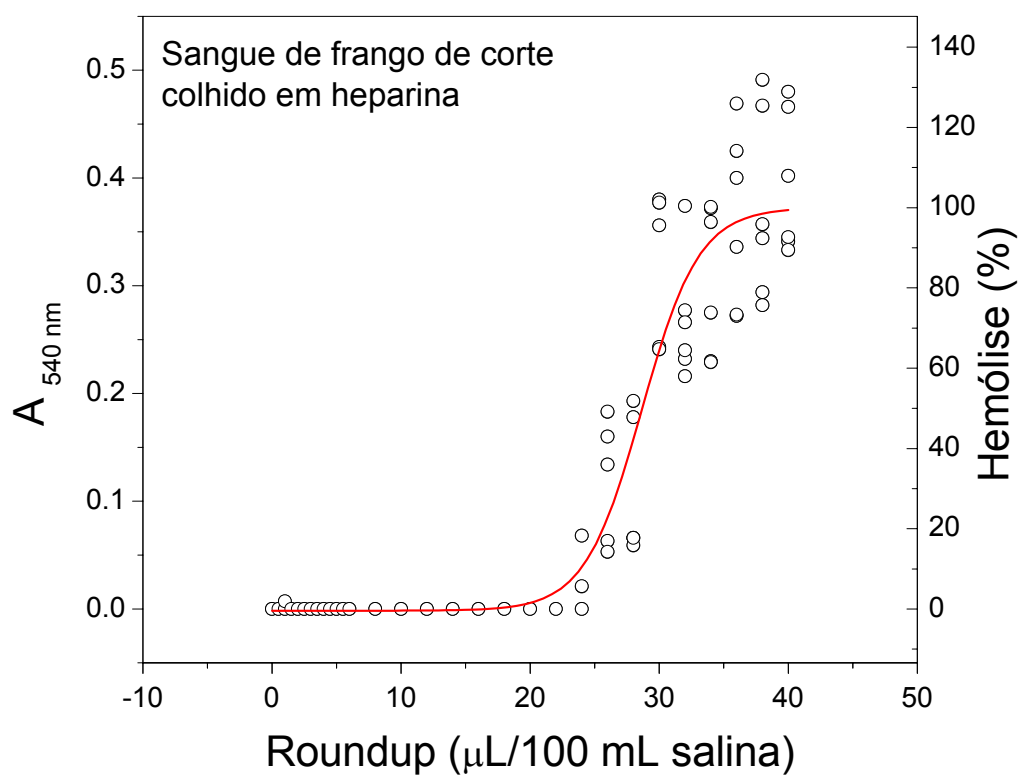


Figura 2. Efeito da concentração do herbicida Roundup, dada em mL da preparação comercial do herbicida por 100 mL de solução salina fisiológica (NaCl 0,9%) sobre a lise de eritrócitos de frangos de corte. Condições: 41 °C; coleta de sangue em heparina como anticoagulante.

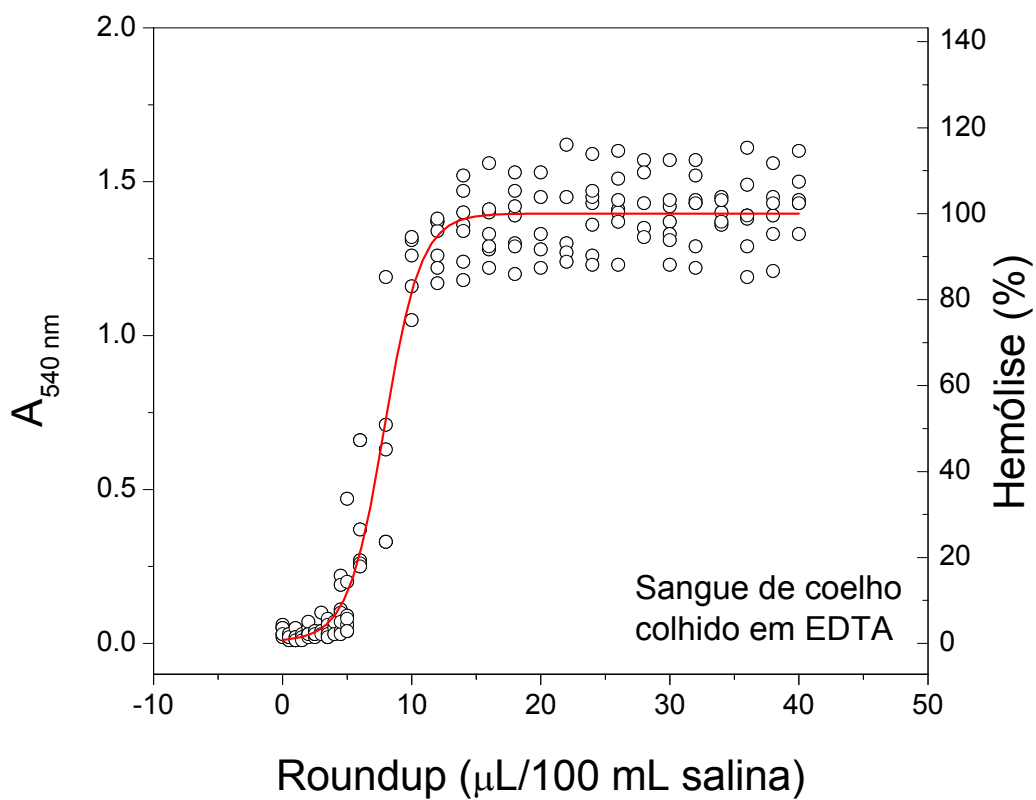


Figura 3. Efeito da concentração do herbicida Roundup, dada em mL da preparação comercial do herbicida por 100 mL de solução salina fisiológica (NaCl 0,9%) sobre a lise de eritrócitos de coelhos. Condições: 37 °C; coleta de sangue em EDTA como anticoagulante.

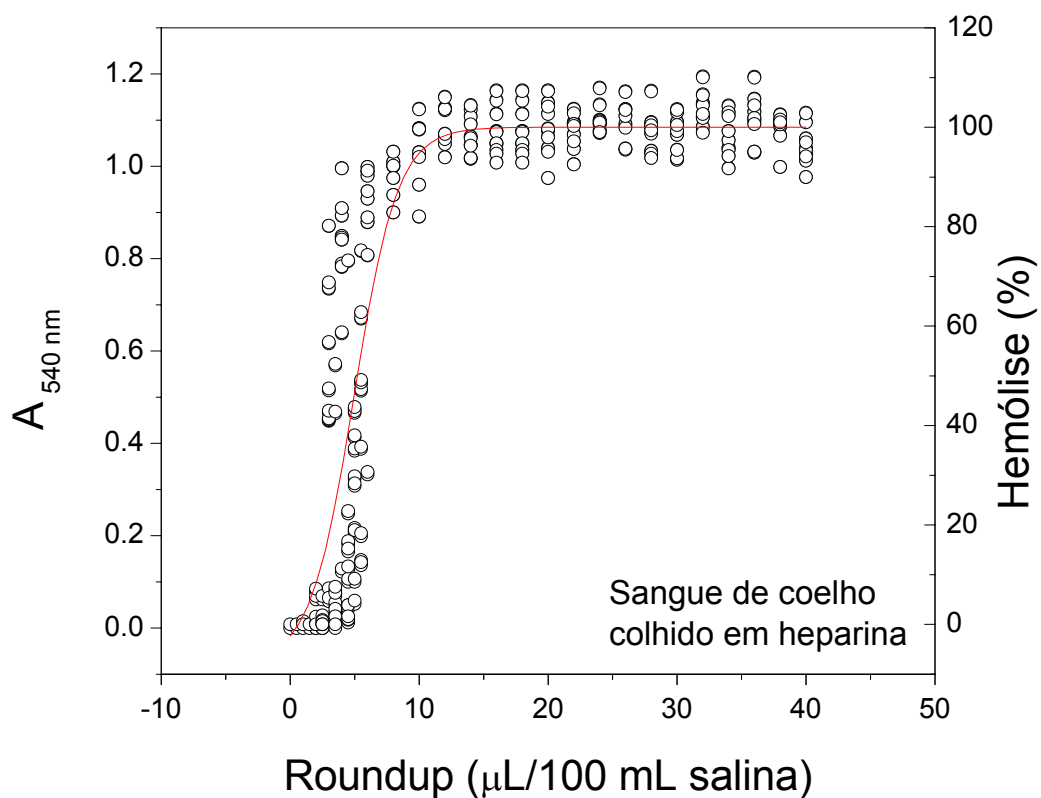


Figura 4. Efeito da concentração do herbicida Roundup, dada em mL da preparação comercial do herbicida por 100 mL de solução salina fisiológica (NaCl 0,9%) sobre a lise de eritrócitos de coelhos. Condições: 37 °C; coleta de sangue em heparina como anticoagulante.

Tabela 2. Valores da altura (h), dados em unidades de absorvância (ΔOD), da curva de lise de eritrócitos de coelhos e de frangos de corte coletados em EDTA ou heparina como anticoagulante.

Animal	EDTA	Heparina	p
Coelho	1,38 $\pm$ 0,14 (N = 7)	1,16 $\pm$ 0,09 (N = 10)	*
Frango	0,73 $\pm$ 0,09 (N = 7)	0,39 $\pm$ 0,08 (N = 6)	*
p [‡]	‡	‡	

* p < 0,05 indicando diferença estatisticamente significativa entre anti-coagulantes (ANOVA).

‡ p < 0,05 indicando diferença estatisticamente significativa entre animais (ANOVA).

Tabela 3. Valores da amplitude (dD), dados em μL de Roundup[®]/100 mL salina, da curva de lise de eritrócitos de coelhos e de frangos de corte coletados em EDTA ou heparina como anticoagulante.

Animal	EDTA	Heparina	P*
Coelho	1,11 $\pm$ 0,58 (N = 7)	1,54 $\pm$ 0,58 (N = 10)	*
Frango	0,27 $\pm$ 0,12 (N = 7)	1,80 $\pm$ 1,19 (N = 6)	*
p [‡]	‡	‡	

* p < 0,05 indicando diferença estatisticamente significativa entre anti-coagulantes (ANOVA).

‡ p < 0,05 indicando diferença estatisticamente significativa entre animais (ANOVA).

DISCUSSÃO

Neste trabalho a estabilidade de eritrócitos foi utilizada como ferramenta para estimar o comportamento das membranas citoplasmáticas frente a agentes exógenos presentes no herbicida Roundup®. A membrana representa a primeira barreira a ser transposta pelo herbicida para entrar no organismo animal e agir afetando ou não o funcionamento da célula.

Nossos resultados demonstraram que o Roundup® induziu a lise dos eritrócitos de frangos de corte e de coelhos dentro de concentrações indicadas pelo fabricante, para uso na agricultura.

Dentro dessa faixa de concentração, eritrócitos humanos e de ratos Wistar também sofreram lise [BATISTA *et al.*, 2007].

As concentrações de Roundup® capazes de promover 50% de lise dos eritrócitos (D_{50}) de sangue humano e de ratos Wistar foram respectivamente de 34,30 e 10,4 $\mu\text{L}/100\text{ mL}$ de salina [BATISTA *et al.*, 2007].

Nossos resultados, com frango e coelho, demonstraram que a lise de 50% (D_{50}) dos eritrócitos de amostras de sangue de frangos de corte e de coelhos, coletadas em EDTA, ocorreu quando as concentrações de Roundup® foram de, respectivamente, 19,30 e 7,72 μL de Roundup em 100 mL de salina (NaCl a 0,9%). Se a resistência de eritrócitos frente à ação de agentes tóxicos do ambiente é, de alguma forma, proporcional à longevidade da espécie, seria de se esperar que os frangos tivessem eritrócitos menos resistentes ao Roundup®, uma vez que a longevidade estimada dos frangos de granja é muito inferior à dos coelhos. Entretanto, isso não ocorreu. É possível que outros fatores associados às condições experimentais, como diferenças na idade dos animais [PENHA-SILVA *et al.*, 2007], a temperatura do ensaio e a natureza do anticoagulante, sejam responsáveis pela diferença observada no D_{50} .

Os ensaios para determinação dos valores de D_{50} dos eritrócitos dos frangos de corte foram conduzidos à temperatura de 41 °C, enquanto os ensaios com os eritrócitos de coelhos foram conduzidos a 37 °C. Como o calor é um poderoso agente caotrópico [FONSECA, 2006], inclusive para as membranas biológicas [CUNHA *et al.*, 2007; PENHA-SILVA *et al.*, 2008], a diferença entre as temperaturas utilizadas nos ensaios pode ter tido impacto na inversão da tendência esperada a partir da longevidade das duas espécies.

A natureza do anticoagulante pode ter influenciado nos valores obtidos de D_{50} . Dados da literatura referentes à ação de anticoagulantes sobre o sangue de frangos de corte são escassos. O EDTA tem conhecido efeito hemolítico em *Cyprinus carpio* L [WALENCIK e WITESKA, 2007]. O EDTA tem a propriedade de quelar cátions, da mesma forma que o glifosato presente nas preparações de Roundup® [AMARANTE JÚNIOR, 2002]. É possível, assim, que algum tipo de interação possa ocorrer entre o EDTA e o glifosato.

Quando os ensaios foram conduzidos com amostras de sangue colhidas com heparina, os valores de D_{50} obtidos para de eritrócitos de frangos e de coelhos foram de 29,50 e 4,98 μ L de Roundup por 100 mL de NaCl a 0,9%. Como houve diferenças significantes entre os valores de D_{50} obtidos para os eritrócitos de amostras de sangue colhidas em EDTA em relação à Heparina, isso indica que a natureza do anticoagulante pode afetar na resistência do eritrócito à lise pelo Roundup®, mas, verificou-se, também, que na presença de Heparina, os eritrócitos de coelhos apresentaram menor resistência á ação hemolítica exercida pelo Roundup® em relação aos eritrócitos de frangos. Como a magnitude da diferença foi ampliada, é provável que essa diferença seja real e não justificada pela diferença na temperatura utilizada nos ensaios com sangue de frangos de corte (41 °C) em relação aos ensaios com sangue de coelhos (37 °C).

A conjunção dos efeitos do anticoagulante, da temperatura, dos princípios presentes no herbicida Roundup® e das características intrínsecas das amostras de sangue das duas espécies consideradas poderia estar produzindo efeitos antagônicos para os anticoagulantes (Tabela 1). A utilização de Heparina produziu uma diminuição nos valores de D_{50} dos eritrócitos de frangos e aumento no D_{50} dos eritrócitos de coelhos.

Se analisarmos esse paradoxo tomando como paradigma a ação do Roundup®, concluiremos que a mudança do anticoagulante de EDTA para Heparina esteve associada a uma estabilização relativa dos eritrócitos de frangos de corte e desestabilização relativa dos eritrócitos de coelhos. Esse antagonismo de ação do glifosato pode ser real e decorrente de mudança de alguma propriedade do meio que esteja afetando o equilíbrio entre estados morfológicos distintos dos eritrócitos [CUNHA *et al.*, 2007; PENHA-SILVA *et al.*, 2008], pois assim como o Roundup®, o etanol também é um agente caotrópico de

membranas e para o etanol, a estabilização foi atribuída a uma diminuição da esferocidade do eritrócito em função do aumento da pressão osmótica [CUNHA *et al.*, 2007; PENHA-SILVA *et al.*, 2008].

Provavelmente, diferenças naturais no volume dos eritrócitos de frangos em relação aos eritrócitos de coelhos, além de diferenças na composição lipídica e no conteúdo do colesterol da membrana celular, podem influenciar a permeabilidade de suas membranas [BACK E NELSON, 1996].

Estudos mostraram diferenças entre os eritrócitos de frangos e eritrócitos de mamíferos. Os eritrócitos de frangos apresentam núcleo, têm menor tempo de maturação e vida média (28 a 35 dias) mais curta do que os eritrócitos dos mamíferos [STURKIE, 1976]. Os frangos, também, apresentam um metabolismo basal mais alto e uma temperatura corporal mais elevada (41 °C) do que a dos mamíferos [STURKIE, 1976].

Os resultados desse trabalho, também, mostram que há outras diferenças no padrão de lise de eritrócitos pelo Roundup® que refletem diferenças existentes entre as espécies estudadas (frangos e coelhos) e a natureza do anticoagulante (**Tabela 2 e Tabela 3**).

A altura da curva de transição de hemólise (h), que representa a concentração de hemoglobina livre na solução [DE FREITAS *et al.*, 2008] foi significativamente maior para as amostras de sangue de coelho do que de sangue de frango (**Tabela 2**) e foi significativamente maior na presença de EDTA do que de heparina. Esse comportamento pode estar relacionado com a natureza quelante de cátions, tanto do EDTA quanto do Glifosato.

A amplitude da transição sigmoidal de lise (dD), que representa o grau de cooperação do sistema com a ação caotrópica do glifosato [DE FREITAS *et al.*, 2008], foi significativamente maior para as amostras de sangue de coelho do que de sangue de frango (**Tabela 3**). Embora, os eritrócitos de coelhos tenham sido menos resistentes do que os de frango, eles respondem de uma maneira menos cooperativa com o aumento da concentração de Roundup®. A amplitude foi significativamente menor na presença de EDTA do que de Heparina, o que indica que o EDTA estaria desfavorecendo a cooperatividade da resposta do eritrócito à ação caotrópica do Roundup®.

CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo permitem concluir que:

1. Embora a natureza do anticoagulante utilizado na coleta de sangue interfira na ação hemolítica do Roundup[®], esse herbicida produziu lise de eritrócitos de frangos e de coelhos dentro da faixa de concentração recomendada pelo fabricante para uso na agricultura.

2. Os eritrócitos de frangos de corte se mostraram mais resistentes do que os eritrócitos de coelhos contra a lise induzida pelo Roundup[®].

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARANTE JUNIOR, O. P.; SANTOS, T. C. R.; BRITO, N. M.; RIBEIRO, M.L. Glyphosate: Properties, toxicity, use and legislation. **Química Nova**, v.25, n.4,p. 589-593, 2002.

ARBUCKLE, T. E.; LIN, Z.; MERY, L. S. An Exploratory Analysis of the Effect of Pesticide Exposure on the Risk of Spontaneous Abortion in an Ontario Farm Population. **Environmental Health Perspectives**, v.109, n.8, p.851-857, 2001.

ASHTON, N. Physiology of red and white blood cells. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v.8, n.5, p. 203-208. 2007.

BARAKAT, K. K. Effect of Cetain Insecticides on the Stabilization And Lysis of Human and Fish Erythrocyte. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, v.1, n.2, p. 195-199, 2005.

BATISTA, M. T. A.; RODRIGUES, H. G.; FONSECA, L. C.; BONETTI, A. M. PENHA-SILVA, N.; AVERSI-FERREIRA, T. A. Estudo dos efeitos do herbicida da classe glicina substituída sobre eritrócitos humanos e de ratos Wistar. Sociedade Brasileira de química. 2007. Resumo expandido.

BELLARY, S. S.; ANDERSON, K. W.; ARDEN, W. A.; BUTTERFIELD, D. A. Effect of lipopolysaccharide on the physical conformation of the erythrocyte cytoskeletal proteins. **Life Sciences**, v.56, n.2, p. 91–98, 1995.

BEURET, C. J.; ZIRULNIK, F.; GIMÉNEZ, M. S. Effect of the herbicide glyphosate on liver lipoperoxidation in pregnant rats and their fetuses. **Reproductive Toxicology**, v.19, n.4, p.501–504, 2005.

BRADBERRY, S. M.; PROUDFOOT, A. T.; VALE, J. A. Glyphosate poisoning. **Toxicological Reviews**, v.23, n.3, p.159-167, 2004.

BUKOWSKA, B.; MICHALOWICZ, J.; DUDA, W. Alterations in human red blood cell properties induced by 3- (dimethylamino) phenol (*in vitro*). **Toxicology in vitro**, v.21, p. 1574-1580, 2007.

CAMPBELL, M.K. **Bioquímica**. 3a. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

CHUNG, T.W; HO, C. P. Changes in viscosity of low shear rates and viscoelastic properties of oxidative erythrocyte suspensions. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v.21, n.2, p.99–103, 1999.

COSTA, M. J.; MONTEIRO, D. A.; OLIVEIRA-NETO, A. L.; RANTIN, F. T.; KALININ, A. L. Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original. **Ecotoxicology**, v.17, n.3, p.153–163, 2007.

CUNHA, C. C.; ARVELOS, L. R.; COSTA, J. O.; PENHA-SILVA, N. Effects of glycerol on the thermal dependence of the stability of human erythrocytes. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, 39, 341-347, 2007.

DE FREITAS MV, NETTO RDE C, DA COSTA HUSS JC, DE SOUZA TM, COSTA JO, FIRMINO CB, PENHA-SILVA N. Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. **Toxicology In Vitro**, v. 22, p.219-24, 2008.

DREW, C.; LAPAIX, F.; EGEE, F.; THOMAS, S.; ELLORY, J. C.; STAINES, H. M. Age-dependent changes in cation transport in the chicken erythrocyte. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**. v.133, p.169-178, 2002.

FONSECA, L.C., CORRÊA, N.C.R., GARROTE-FILHO, M.S., CUNHA, C.C., PENHA-SILVA, N. Effects of the solvent composition on the stability of proteins in aqueous solutions. **Química Nova**, v. 29, p. 543-548, 2006.

GEHIN, A.; GUYON, C.; NICOD, L. Glyphosate-induced antioxidant imbalance in HaCaT: The protective effect of Vitamins C and E. **Environmental. Toxicology and Pharmacology**, v.22, n.1, p.27–34, 2006.

GLUSCZAK, L.; DOS SANTOS, M. D.; CRESTANI, M.; BRAGA DA FONSECA, M.; DE ARAUJO PEDRON, F.; FRESCURA DUARTE, M.; PIMENTAL VIEIRA, V. L. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 65, n.2, p.237–241, 2006.

GLUSCZAK, L.; MIRON, D. S.; MORAES, B. S.; SIMÕES, R. R.; SCHETINGER, M. R. C.; MORSCH, V. M.; LORO, V. L. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology**, v.146, n.4, p.519–524, 2007.

GRISOLIA, C. K. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. **Mutation Research**, v.518, n.2, p.145–150, 2002.

JIRAUNGKOORSKUL, W., UPATHAM, E. S., KRUATRACHUE, M., SAHAPHONG, S., VICHASRI-GRAMS, S., POKETHITIYOOK, P. Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Environmental Toxicology**, v.18, n.4, p.260–267, 2003.

LANGIANO, V. C.; MARTINEZ, C. B. R. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, Toxicology & Pharmacology**, v.147, n.2, p.222–231, 2008.

NARENDRA, M.; BHATRACHARYULU, N. C.; PADMAVATHI, P.; VARADACHARYULU, N. C. Prallethrin induced biochemical changes in erythrocyte membrane and red cell osmotic haemolysis in human volunteers. **Chemosphere**, v.67, n.6, p.1065–1061, 2007.

OLIVEIRA, A. G.; TELLES, L. F.; HESS, R. A.; MAHECHA, G. A. B.; OLIVEIRA, C. A. Effects of the herbicide Roundup on the epididymal region of drakes *Anas platyrhynchos*. **Reproductive Toxicology**, v.23, n.2, p.182–191, 2007.

PEIXOTO, F. Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. **Chemosphere**, v.61, n.8, p. 1115–1122, 2005.

PENHA-SILVA, N.; FIRMINO, C.B.; REIS, F.G.F.; DA COSTA HUSS, J. C.; DE SOUZA, T. M. T.; DE FREITAS, M. V.; NETTO, R. C. M. Influence of age on the

stability of human erythrocyte membranes. **Mechanisms of ageing and development**, 128, 444-449, 2007.

PENHA-SILVA N, ARVELOS LR, CUNHA CC, AVERSI-FERREIRA TA, GOUVÊA-E-SILVA LF, GARROTE-FILHO MS, FINOTTI CJ, BERNARDINO-NETO M, DE FREITAS REIS FG. Effects of glycerol and sorbitol on the thermal dependence of the lysis of human erythrocytes by ethanol. **Bioelectrochemistry**. 2008 Apr 13. [Epub ahead of print].

PIENIAŻEK, D.; BUKOWSKA, B.; DUDA, W. Comparison of the effect of Roundup Ultra 360 SL pesticide and its active compound glyphosate on human erythrocytes. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.79, n.2, p.58–63, 2004.

SHIGA, T., MAEDA, N. Influence of membrane fluidity on erythrocyte functions. **Biorheology**, v.17, n.5-6, 485–499, 1980.

STURKIE, P.D. Blood: physical characteristics, formed elements, hemoglobin, and coagulation. In: STURKIE, P.D. (ED.). **Avianphysiology**. New York: Springer-Verlag, 1976. p.53-75.

TSUI, M. T. K.; CHU, L. M. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. **Chemosphere**, v.52, n.7, p.1189–1197, 2003.

TSUI, M.T.K.; CHU, L. M. Environmental fate and non-target impact of glyphosate-based herbicide (Roundup®) in a subtropical wetland. **Chemosphere**, v.71, n.3, p.439-446, 2008.

WALENCIK, J; WITESKA, M. The effects of anticoagulants on hematological indices and blood cell morphology of common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v.146, p.331-335, 2007.

WATANABE, H.; KOBAYASHI, A.; YAMAMOTO, T.; SUZUKI, S.; HAYASHI, H.; YAMAZAKI, N. Alterations of human erythrocyte membrane fluidity by oxygen-derived free radicals and calcium. **Free Radical Biology & Medicine**, v.8, n.6, p.507–514, 1990.

WEBSTER, N. R.; TOOTHILL, C. Inorganic phosphate transport across the red blood cell membrane: the effect of exposure to hyperoxia. **Clinica Chimica Acta; international journal of clinical chemistry**, v.167, n.3, p.259–265. 1987.

WU, J. Y.; CHANG, S. S.; TSENG, C. P.; DENG, J. F.; LEE, C. C. Parenteral glyphosate-surfactant herbicide intoxication. **The American Journal of Emergency Medicine**, v.24, n.4, p.504-506, 2006.

YAO, C. C.; ZHA, Z. G. Effects of incubation pH on the membrane deformation of a single living human red blood cell. **Current Applied Physics**, v.7, n.1, p.11–14, 2007.

YUE, Y.; ZHANG, Y.; ZHOU, L.; QIN, J.; CHEN, X. In vitro study on the binding of herbicide glyphosate to human serum albumin by optical spectroscopy and molecular modeling. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.90, n.1, p.26–32, 2008.